

|               |   |
|---------------|---|
| 氏 名 (本籍)      | 出 羽 康 明 (栃木県)   |
| 学 位 の 種 類     | 博士 (獣医)   |
| 学 位 記 番 号     | 獣医博甲第 2 7 7 号   |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 2 1 年 3 月 1 3 日  |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 3 条第 1 項該当  |
| 研 究 科 及 び 専 攻 | 連合獣医学研究科<br>獣医学専攻   |
| 研究指導を受けた大学    | 東京農工大学  |
| 学 位 論 文 題 目   | 非遺伝毒性肝発がん物質の発がんメカニズムに関する分子病理学的研究  |
| 審 査 委 員       | 主査 東京農工大学 教 授 三 森 国 敏<br>副査 帯広畜産大学 教 授 松 井 高 峯<br>副査 岩 手 大 学 教 授 岡 田 幸 助<br>副査 東京農工大学 教 授 下 田 実<br>副査 岐 阜 大 学 教 授 柵 木 利 昭 |

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

肝酵素誘導は、異物の解毒排泄を促進するための適応反応とみなされているが、CYP1A 酵素誘導作用を有する化学物質には、その代謝過程に起因して活性酸素種(ROS)の産生をみるものがあり、ROS による酸化ストレスの肝発がんへの関与も示唆されている。しかしながら、その分子メカニズムの詳細は明らかではない。そこで本研究では、CYP1A 誘導作用を示す非遺伝毒性発がん物質の内、動物用駆虫薬オクスフェンダゾール(OX)及び合成フラボンである  $\beta$ -ナフトフラボン(BNF)の肝発がん機序について、酸化ストレスに着目して解析を行った。

第一に、OX をラットに反復投与した肝臓における変動遺伝子群の同定を行った。雄性 F344 ラットに 0 ないし 0.05% の OX を 3 週間混餌投与した肝臓についてマイクロアレイ及び real-time RT-PCR 法を用いた定量的 mRNA 発現解析を行った結果、第 I 相薬物代謝酵素である *Cyp1a1* や酸化ストレス応答性転写因子 Nrf2 により発現調節される遺伝子 (*Gpx2*, *Afar*, *Yc2*)において、対照群と比較して 2 倍以上の発現増加が確認された。さらに投与期間を 9 週間、投与濃度を 0.1%とすることにより、投与期間・濃度に関連した遺伝子発現増加がみられた。以上の結果から、OX 投与肝では酸化ストレス応答性反応が惹起されており、発がん促進作用への関与が示唆された。

第二に、OX の肝発がん促進機序における酸化ストレスの役割についてさらに検討するため、二段階肝発がんモデルを用いて実験を行った。雄性 F344 ラットに DEN を単回腹腔内投与し、投与 2 週間後から 0 ないし 0.05% の OX を 6 週間混餌投与した。OX 投与 1 週間後には 2/3 部分肝切除を施した。その結果、OX 投与により、肝前がん病変指標である GST-P 陽性細胞数の有意な増加並びに *Cyp1a1*, *Cyp1a2* 及び抗酸化酵素関連遺伝子

(*Gpx2*, *Afar*, *Yc2*)の mRNA 発現増加が確認された。また酸化ストレス指標である脂質過酸化量、酸化的 DNA(8-OHdG)量及び単離肝ミクロソームからの活性酸素種(ROS)産生量並びに PCNA 陽性細胞数は、いずれも OX 投与により有意な増加を示した。以上の結果から、OX による肝発がん促進機序にはその代謝過程で生じる酸化ストレス及び細胞増殖の亢進が関与している可能性が示唆された。

第三に、BNF の肝発がん促進機序における酸化ストレスの関与について検討した。ラット二段階肝発がんモデルを用いて BNF の 0, 0.05 ないし 1%を 6 週間投与し、OX と同様の解析を行った。その結果、GST-P 陽性細胞数(数・面積)の有意な増加が認められ、マイクロアレイ及び定量的遺伝子発現解析の結果から、第 I 相(*Cyp1a1*, *Cyp1b1*)・第 II 相(*Gpx2*, *Afar*, *Yc2*)薬物代謝酵素の発現増加及び細胞増殖抑制遺伝子 p21(*Cdkn1a*)の発現減少が認められた。同時に測定した脂質過酸化量、酸化的 DNA 量及び単離肝ミクロソームからの活性酸素種産生量並びに PCNA 陽性細胞数についても有意な増加が認められた。以上の結果から、BNF の肝発がん促進には、OX と同様の作用機序が関与していることが示唆された。

第四に、OX 及び BNF の発がん促進過程において確認された酸化ストレス応答・細胞増殖亢進の腫瘍形成への関与を検討するため、BNF の長期投与により腫瘍を形成させた肝臓において、これらの分子の発現変動を解析した。二段階肝発がんモデルにおいて 0 ないし 1%の BNF を 28 週間投与した結果、対照群と比較して、肝細胞変異巣・腺腫の発生率・発生頻度に有意な増加が認められた。また肝細胞変異巣・腺腫では、周辺組織と比較して PCNA 陽性細胞数の明らかな増加が認められる共に、細胞増殖抑制因子である C/EBP $\alpha$  及び p21 の染色性低下が確認された。薬物代謝酵素については、CYP1A1, CYP1B1 の染色性低下と共に AFAR, GPX2 の染色性増強が認められた。これらの変動と各 mRNA 発現変動との間には良好な相関が認められた。以上の結果から、BNF によって誘発された肝細胞変異巣・腺腫では、酸化ストレスからの回避並びに増殖活性の亢進が認められ、これらの変化の発がん機序への寄与が示唆された。

以上のように、CYP1A 誘導作用を示す OX 及び BNF の肝発がん促進機序には、その代謝過程に起因した ROS の産生による酸化ストレスの誘発並びに細胞増殖の亢進が寄与していることが示唆された。非遺伝毒性肝発がん物質の中には、CYP1A 誘導作用を有するものが多くみられるが、今回の研究成果は今後の非遺伝毒性肝発がん物質の機序解明の一助となるものと考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、非遺伝毒性肝発がん物質とみなされている化合物の内、CYP1A 酵素誘導作用を有する化学物質の肝発がん促進機序について検討することを目的として、動物用駆虫薬オクスフェンダゾール(OX)及び合成フラボンである  $\beta$ -ナフトフラボン(BNF)を用い、これらの代謝過程において生じると考えられる酸化的ストレスの関与に着目して解析を行った。

第一章では、OX をラットに反復投与し、肝臓における変動遺伝子群の解析を行った。その結果、第 I 相薬物代謝酵素 Cyp1A や酸化ストレス応答性転写因子 Nrf2 により発現調節される抗酸化遺伝子群の発現上昇が投与期間及び投与濃度に関連して認められたことから、OX 投与肝では酸化ストレス応答性反応が惹起されており、その発がん促進機序への関与が示唆された。

第二章では、OX の肝発がん促進機序における酸化ストレスの役割についてさらに検討するため、二段階肝発がんモデルを用いて実験を行った。その結果、肝前がん病変巣の増加と共に抗酸化酵素の遺伝子発現や酸化ストレス指標の増加、細胞増殖活性の上昇がみられたことから、OX の肝発がん促進機序における酸化ストレス及び細胞増殖亢進の関与が示唆された。

第三章では、BNF の肝発がん促進機序における酸化ストレスの関与について、ラット二段階肝発がんモデルを用いて検討を行った。その結果、第二章と同様の結果が認められ、BNF の肝発がん促進においても OX と同様の作用機序が関与していることが示唆された。

第四章では、確認された酸化ストレス応答・細胞増殖亢進の腫瘍形成への関与を検討するため、BNF 投与により腫瘍を形成させた肝臓において、これらの分子の発現変動を解析した。その結果、BNF によって誘発された肝細胞変異・腺腫では、酸化ストレスからの回避及び増殖活性の亢進が認められ、これらの変化の発がん機序への寄与が示唆された。

以上の結果から、CYP1A 誘導作用を示す OX 及び BNF の肝発がん促進機序には、その代謝過程に関連した酸化ストレスの誘発及び細胞増殖の亢進が寄与していることが示唆された。本研究は、酵素誘導作用を示す非遺伝毒性肝発がん物質の機序解明の一助となるものと考えられた。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Gene expression analyses of the liver in rats treated with oxfendazole  
著 者 名 : Dewa, Y., Nishimura, J., Muguruma, M., Matsumoto, S., Takahashi, M., Jin, M. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名 : Archives of Toxicology  
巻・号・頁・発行年 : 81(9): 647-654, 2007
- 2) 題 目 :  $\beta$ -Naphthoflavone enhances oxidative stress responses and the induction of preneoplastic lesions in a diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis model in partially hepatectomized rats  
著 者 名 : Dewa, Y., Nishimura, J., Muguruma, M., Jin, M., Saegusa, Y., Okamura, T., Tasaki, M., Umemura, T. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名 : Toxicology  
巻・号・頁・発行年 : 244(2-3): 179-189, 2008
- 3) 題 目 : Involvement of oxidative stress in hepatocellular tumor-promoting activity of oxfendazole in rats  
著 者 名 : Dewa, Y., Nishimura, J., Muguruma, M., Jin, M., Kawai, M., Saegusa, Y., Okamura, T., Umemura, T. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名 : Archives of Toxicology  
巻・号・頁・発行年 : In Press

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Molecular analysis on the possible mechanism of  $\beta$ -naphthoflavone-induced hepatocarcinogenesis in rats  
著 者 名 : Yokouchi, Y., Muguruma, M., Moto, M., Takahashi, M., Jin, M., Kenmochi, Y., Kohno, T., Dewa, Y. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology  
巻・号・頁・発行年 : 20(1): 29-37, 2007
- 2) 題 目 : Effect of fenofibrate on oxidative DNA damage and on gene expression related to cell proliferation and apoptosis in rats  
著 者 名 : Nishimura, J., Dewa, Y., Muguruma, M., Kuroiwa, Y., Yasuno, H., Shima, T., Jin, M., Takahashi, M., Umemura, T. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名 : Toxicological Sciences  
巻・号・頁・発行年 : 97(1): 44-54, 2007
- 3) 題 目 : Possible involvement of oxidative stress in piperonyl butoxide induced hepatocarcinogenesis in rats  
著 者 名 : Muguruma, M., Unami, A., Kanki, M., Kuroiwa, Y., Nishimura, J., Dewa, Y., Umemura, T., Oishi, Y. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名 : Toxicology  
巻・号・頁・発行年 : 236(1-2): 61-75, 2007

- 4) 題 目 : Concurrent administration of ascorbic acid enhances liver tumor-promoting activity of kojic acid in rats  
著 者 名 : Takabatake, M., Shibutani, M., Dewa, Y., Nishimura, J., Yasuno, H., Jin, M., Muguruma, M., Kono, T. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名 : Journal of Toxicological Sciences  
巻・号・頁・発行年 : 33(2): 127-140, 2008
- 5) 題 目 : Modifying effect of *Siraitia grosvenori* extract on piperonyl butoxide-promoted hepatocarcinogenesis in rats  
著 者 名 : Yasuno, H., Nishimura, J., Dewa, Y., Muguruma, M., Takabatake, M., Murata, Y., Shibutani, M. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名 : Journal of Toxicological Sciences  
巻・号・頁・発行年 : 33(2): 197-207, 2008
- 6) 題 目 : Hepatocarcinogenic susceptibility of rasH2 mice to troglitazone in a two-stage hepatocarcinogenesis model  
著 者 名 : Jin, M., Saekusa, Y., Dewa, Y., Nishimura, J., Matsumoto, S., Shibutani, M., Hasumi, K. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名 : Archives of Toxicology  
巻・号・頁・発行年 : In Press
- 7) 題 目 : Threshold dose of piperonyl butoxide that induces reactive oxygen species-mediated hepatocarcinogenesis in rats  
著 者 名 : Muguruma, M., Kawai, M., Dewa, Y., Nishimura, J., Saegusa, Y., Yasuno, H., Jin, M., Matsumoto, S., Takabatake, M., Arai, K. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名 : Archives of Toxicology  
巻・号・頁・発行年 : In Press
- 8) 題 目 : Possible involvement of oxidative stress in fenofibrate-induced hepatocarcinogenesis in rats  
著 者 名 : Nishimura, J., Dewa, Y., Okamura, T., Muguruma, M., Jin, M., Saegusa, Y., Umemura, T. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名 : Archives of Toxicology  
巻・号・頁・発行年 : 82(9): 641-654, 2008
- 9) 題 目 : Piperonyl butoxide activates c-Jun and ATF-2 in the hepatocytes of mice  
著 者 名 : Muguruma, M., Arai, K., Moto, M., Nishimura, J., Dewa, Y. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名 : Archives of Toxicology  
巻・号・頁・発行年 : 82(10): 749-753, 2008
- 10) 題 目 : Extremely weak tumor-promoting effect of troglitazone on splenic hemangiosarcomas in rasH2 mice induced by urethane  
著 者 名 : Jin, M., Matsumoto, S., Dewa, Y., Nishimura, J., Saekusa, Y., Hasumi, K. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名 : Archives of Toxicology  
巻・号・頁・発行年 : 82(10): 771-777, 2008
- 11) 題 目 : Hepatocarcinogenic susceptibility of fenofibrate and its possible mechanism of carcinogenicity in a two-stage hepatocarcinogenesis model of rasH2 mice  
著 者 名 : Kawai, M., Jin, M., Nishimura, J., Dewa, Y., Saegusa, Y., Matsumoto, S., Taniai, E., Shibutani, M. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名 : Toxicologic Pathology  
巻・号・頁・発行年 : In Press
- 12) 題 目 : Role of Nrf2 and oxidative stress on fenofibrate-induced hepatocarcinogenesis in rats  
著 者 名 : Nishimura, J., Dewa, Y., Okamura, T., Jin, M., Saegusa, Y., Kawai, M., Umemura, T., Shibutani, M. and Mitsumori, K.  
学術雑誌名 : Toxicological Sciences  
巻・号・頁・発行年 : 106(2): 339-349, 2008